



TITLE:

ヒト悪性腫瘍とヌードマウス移植腫瘍の制癌剤感受性の相関に関する研究

AUTHOR(S):

水野, 恵文

CITATION:

水野, 恵文. ヒト悪性腫瘍とヌードマウス移植腫瘍の制癌剤感受性の相関に関する研究. 日本外科宝函 1984, 53(1): 221-231

ISSUE DATE:

1984-01-01

URL:

<http://hdl.handle.net/2433/208741>

RIGHT:

ヒト悪性腫瘍とヌードマウス移植腫瘍の 制癌剤感受性の相関に関する研究

京都大学医学部外学教室第2講座（指導：日笠頼則教授）

水 野 恵 文

〔原稿受付：昭和58年10月3日〕

Correlation between in Vitro Chemosensitivity of Human Tumors and the Corresponding Xenografts in Nude Mice

YOSHIHUMI MIZUNO

The 2nd Department of Surgery, Faculty of Medicine, Kyoto University
(Director: Prof. Dr. YORINORI HIKASA)

Many investigators have transplanted human malignant tumors into nude mice and their studies have shown that morphological and functional properties of original tumors were retained well in the corresponding xenografts.

However, preservation of chemosensitivity in the xenograft is still unclear. As a means of investigating whether the chemosensitivity of the xenograft in nude mice is similar to that of the original tumor when it grows in the patient, the author examined the in vitro colony formation and chemosensitivity of patient's original tumors and the corresponding xenografts in soft agar clonogenic assay.

The following results were obtained. In this study morphology of the original tumors was retained well in the xenografts. The xenografts showed several times higher plating efficiencies and became more sensitive to anticancer drugs than the original tumors.

However, the spectrum of sensitivity to anticancer drugs of original tumors was well-preserved in the corresponding xenografts.

The present results indicate that human tumor xenografts may be used to develop quantitative chemosensitivity tests.

Key word: Nude mouse, Xenograft, Clonogenic assay, Chemosensitivity.

索引語：ヌードマウス，異種移植腫瘍，クロノジェニックアッセイ，制癌剤感受性.

Present address: The 2nd Department of Surgery, Faculty of Medicine, Kyoto University, Kyoto 606, Japan.

結 言

ヌードマウスは、1962年、Glasgow の Grist によって発見された毛の無い突然変異種のマウスで、Issacson および Cattanach により報告された。1966年、Flanagan⁶⁾ により遺伝的解析がなされ、その形質が第11染色体の劣性遺伝子 (nu) により支配されていることが示された。1968年、Pantelouris²⁷⁾ がヌードマウスに胸腺が欠損していることを報告し、以後この免疫不全状態が、種々の研究に用いられるようになった。1969年、Rygaard と Povlsen³⁰⁾ が初めてヒト結腸癌のヌードマウスへの移植に成功し、以後多くの悪性腫瘍の移植が報告され、これを用いた研究がなされている。

現在、悪性腫瘍の化学療法において、たとえ同一組織型であっても、個々の症例ごとに制癌剤感受性が異なることが知られ、癌化学療法の成績を向上させる為には、腫瘍ごとに制癌剤感受性の判定を行なうことが要求されている。この為、種々の *in vitro* の制癌剤感受性試験や、ヌードマウスに生着した腫瘍を用いた *in vivo* の制癌剤感受性試験が試みられ、その成績が蓄積されてきている。

一般に、ヌードマウスに生着した腫瘍は継代を重ねても、組織学的、機能的に原腫瘍の特性を良好に保持すると報告され、制癌剤感受性においても原腫瘍の性質を維持していると仮定して、ヌードマウスを用いた実験化学療法がすすめられている。しかし、その判定結果と臨床効果との相関を検討した報告は未だ少数であり、又、原腫瘍とヌードマウス移植腫瘍の制癌剤感受性を clonogenic assay を用いて直接比較検討した報告はない。

Clonogenic assay は、二層軟寒天培地において腫瘍細胞が増殖、コロニーを形成することを利用し、制癌剤の示すコロニー形成抑制率で効果判定を行う *in vitro* の制癌剤感受性試験で、その判定結果と臨床効果との高い相関によって注目を集めている。

著者はこの clonogenic assay を用いて、原腫瘍とそのヌードマウス移植腫瘍の制癌剤感受性を比較し、ヌードマウス移植腫瘍の特性について検討を加えた。

実験材料及び方法

ヌードマウス：

4～8週齢の雄 BALB/C nu/nu マウス (日本クレア) を使用した。ヌードマウスの飼育及び実験操作は、Specific Pathogen Free 条件下に行った。

症例：

胃癌11例、大腸癌 6 例、神経芽細胞腫 4 例、腎癌 2 例、睾丸腫瘍 2 例、肝芽細胞腫 1 例、卵黄嚢癌 1 例、悪性黒色腫 1 例、脂肪肉腫 2 例の計30症例を実験に用いた。

各症例の手術摘出標本の一部を可及的無菌的に採取し、Penicillin, Streptomycin, Amphotericin-B 加 α -MEM (MEM Alpha Medium, Irvine Scientific) 中にて移送、clonogenic assay 及びヌードマウスへの移植に使用した。

Clonogenic assay (Fig. 1):

腫瘍細胞の酵素学的分離には、0.14% Collagenase type I, 0.03% (500 KU/ml) Deoxyribonuclease type I (以上, Sigma Chemical Company, ST Louis USA) 加 α -MEM (以下, Enzyme Solution), 及び 0.03% Deoxyribonuclease 加 α -MEM (以下, DNase Solution) を用いた。

腫瘍細胞の培養には、Penicillin (50 U/ml), Streptomycin (50 mcg/ml), Amphotericin-B (1.2 mcg/ml) (Gibco Laboratories, Grandisland Biological Company), 15%牛胎児血清加 CEM (chee's modification of Eagle's medium) (以下, Culture Solution) を用いた。

実験室に移送された腫瘍は鋭剪刀にて十分に細切し、腫瘍 1 gr あたり 10～20 ml の Enzyme Solution 中にてゆるやかに攪拌しながら 37°C CO₂ incubator 内で 30～60分間酵素を作用させ、腫瘍細胞の分離を行った。これを、滅菌した 2 枚ガーゼにて濾過し残渣を除去、800～1000 rpm にて遠沈し上清の酵素液は吸引廃棄した。沈殿した腫瘍細胞に DNase solution を加え、軽くピペッティングを行い細胞を浮遊させ、再度遠沈後、上清の DNase solution は吸引廃棄した。腫瘍細胞は culture solution にて suspend し、trypan blue exclusion test にて生細胞比率を測定した後、生細胞数が 6×10^5 /ml～ 1.5×10^6 /ml となるように調整した。

培養には、35×10 mm の Petri dish (Linbro 76-247-05; Flow Laboratories) を用いた。Culture solution に Bacto-agar (Difco, Lab. Detroit, Mich) を 0.5% となるように加え、各 dish に 1 ml ずつ分注し下層を作成した。調整された腫瘍細胞浮遊液を 1 ml ずつ試験管に分注、無制癌剤の control 1～2本を除き、各々に制癌剤と 50°C に温められた 2 ml の agar 加 culture solution を加え、0.3% Agar 加腫瘍細胞浮遊液とし、あらかじめ作成しておいた 3 枚の Petri dish 下層上に 1 ml ずつ分注、上層を作成した。

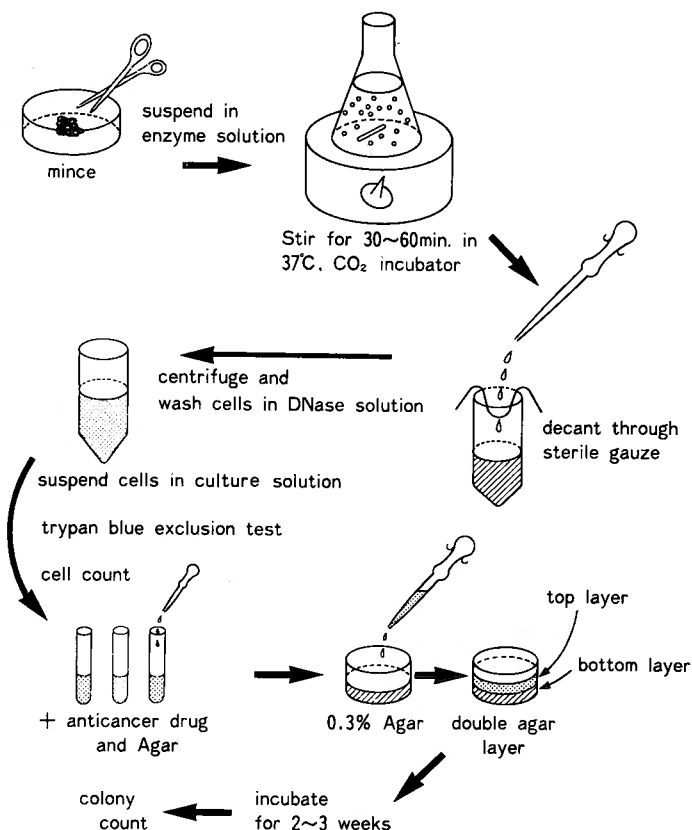


Fig. 1. Clonogenic Assay

Assay に使用した制癌剤は, Adriamycin (ADM), Actinomycin-D (ACTD), BCNU, Bleomycin (BLM), Cis-Platinum (Cis-DDP), 5-FU, Melphalan (Melfh), Mitomycin-C (MMC), Vincristine (VCR) であり, 腫瘍細胞と各制癌剤との接触濃度は, 制癌剤常用量の人体血中ピークレベル濃度²⁾を参考に決定した (chart 1).

腫瘍細胞と制癌剤とは持続接触となり, 又, 1 枚の Petri dish には $2 \times 10^5 \sim 5 \times 10^5$ 個の腫瘍細胞が³⁾ plate されたことになる. これ等の dish は倒立顕微鏡で cell cluster の有無を確かめ, 各実験につき最低 1 枚の dish をホルマリンを加えた後冷蔵保存した. Plate の終わった Petri dish は 37°C CO_2 incubator 内で 2 ~ 3 週間培養, 倒立顕微鏡にてコロニー形成を確認した後, Biotran III 全自動コロニーカウンターを用いて各 dish のコロニー数を測定した. 50 個あるいはそれ以上の細胞の集団をコロニーと判定し, control dish において 30 個以上のコロニー形成を認めたもののみを制癌剤感受性判定可能とした. 又, plate 時に冷蔵保存

した dish を用いて, 少数の cell cluster による誤差を調整した.

制癌剤の抗腫瘍効果は, 無制癌剤の control dish に形成されたコロニー数に対して, 制癌剤とともに plate された dish のコロニー形成数が何パーセント抑

Chart 1. Drug Concentration Used to Determine In Vitro Sensitivity

Drug	Concentration ($\mu\text{g}/\text{ml}$)
Adriamycin	0.4
Actinomycin-D	0.1
BCNU	2.0
Bleomycin	2.0
Cis-DDP	2.0
5-FU	10.0
Melphalan	1.0
Mitomycin	3.0
Vincristine	0.5

制されたか(コロニー形成抑制率)を計算して判定した。
ヌードマウスへの移植 (chart 2):

30例中, 21例は原腫瘍より作成された腫瘍細胞浮遊液の一部を, 25G 針にてヌードマウス背部皮下に注入した。残る 9 例は, 原腫瘍を鋭剪刀にて十分に細切し, 均一な状態にしたものの一部を 16G 移植針を用いて,

ヌードマウス背部皮下に移植した。ヌードマウスに生着した腫瘍は, エーテル麻酔下に無菌的に摘出し, 同様の手技にて clonogenic assay を施行した。

結 果

ヌードマウスへの生着率 (chart 2):

Chart 2. Heterotransplantation of Human Malignant Tumors to Nude Mice

	Age	Sex	Organ	Primary/ Metastasis	Histology	Number of inoculated malignant cells	Take in nude mice	Successful colony formation in clonogenic assay
1	57	F	stomach	P	tub 1	1×10^7	+	+
2	72	M	stomach	L.N.M.	por	3×10^7	-	
3	65	F	stomach	L.N.M.	tub 2	4×10^7	-	
4	63	M	stomach	L.N.M.	tub 1	7×10^6	-	
5	42	M	stomach	L.N.M.	por	1×10^7	-	
6	68	F	stomach	P	tub 1	2×10^7	-	
7	75	F	stomach	L.N.M.	tub 1	block*	-	
8	78	F	stomach	P	tub 1	block	-	
9	50	M	stomach	omental M.	por	block	+	+
10	52	M	stomach	L.N.M.	tub 1	block	+	-
11	52	M	stomach	P	tub 1	block	+	-
12	61	F	stomach	P	malignant lymphoma	1×10^8	-	
13	34	M	colon	P	well diff.	1×10^8	-	
14	36	M	colon	P	well diff.	1×10^8	-	
15	36	M	colon	L.N.M.	well diff.	5×10^6	+	+
16	61	F	colon	P	moderately diff.	5×10^6	-	
17	47	F	colon	liver M.	well diff.	block	+	-
18	59	M	colon	P	mucinous	block	+	+
19	64	M	kidney	P	renal cell carci.	2×10^7	-	
20	54	M	kidney	P	renal cell carci.	2×10^6	-	
21	58	F	kidney	M	metastatic malignant melanoma	2×10^7	+	+
22	29	M	testis	P	embryonal carci.	5×10^6	-	
23	29	M	testis	P	embryonal carci.	2×10^7	+	+
24	3	F	adrenal cortex	L.N.M.	neuroblastoma	5×10^7	+	+
25	6	M	cervix	L.N.M.	neuroblastoma	5×10^7	-	
26	2	F	retro- peritoneum	P	neuroblastoma	5×10^6	-	
27	9	M	cervix	L.N.M.	neuroblastoma	block	-	
28	4	M	lung.	lung M.	hepatoblastoma	1×10^7	+	+
29	2	F	mediasti- num	P	Yolk sac tumor	5×10^7	+	-
30	33	F	retro peritoneum	P	liposarcoma	block	-	

* inoculated by trochar to nude mice
L.N.M. : lymph node metastasis

Chart 3. Plating Efficiency of Original and Xenografted Tumors in Clonogenic Assay

Case	Original Tumor	Tumor Xenograft	
1) Gastric cancer	0.02 %	0.18 %	(35 days*)
2) Gastric cancer	0.01	0.08	(22 days)
3) Colon cancer	0.02	0.08	(9 days)
4) Colon cancer**	0.04	0.22	(14 days)
5) Malignant melanoma	0.09	0.02	(7 days)
6) Testicular tumor	0.04	0.19	(8 days)
7) Neuroblastoma	0.03	0.5	(4 days)
8) Hepatoblastoma	0.28	0.12	(11 days)

* volume doubling time of tumor grown in nude mice.

** 2-nd generation in nude mice.

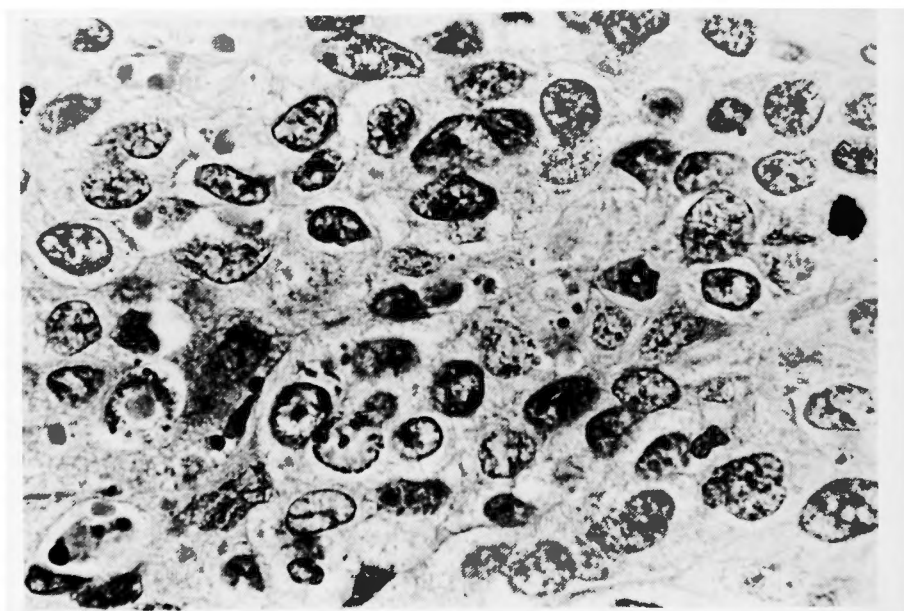
消化器癌を中心に30例の悪性腫瘍をヌードマウスに移植した。細胞浮遊液を注入した21例中7例(33%)及び、細切した後移植針を用いて移植した9例中5例(56%)の計12例が、ヌードマウスに生着した。しかし、原腫瘍とヌードマウス移植腫瘍の両者の制癌剤感受性判定及び比較が可能であったものは8例であった。

各腫瘍のコロニー形成率 (chart 3):

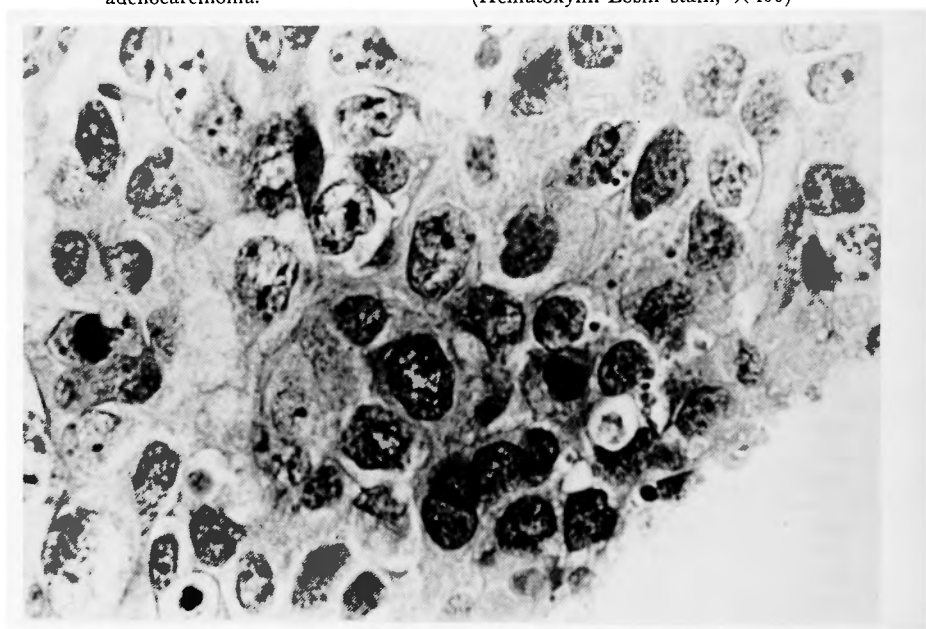
症例4 colon cancer は、ヌードマウス継代2代目のものを用いた。他の7例はヌードマウス継代初代の腫瘍を用いて検討した。症例5 malignant melanoma と症例8 hepatoblastoma は、ヌードマウス移植腫瘍においてコロニー形成率の低下が認められたが、この

Chart 4. Colony Inhibition Rate of Anticancer Drugs

Case	Original tumor	Tumor xenograft	Case	Original tumor	Tumor xenograft
	%	%		%	%
1) Gastric cancer			6) Testicular tumor		
MMC	0	61	Melph	12	33
ADR	0	65	Cis DDP	56	66
5FU	0	63	BLM	39	81
Melph	22	76	ACTD	0	30
2) Gastric cancer			7) Neuroblastoma		
MMC	84	76	MMC	34	98
ADR	92	88	ADR	84	98
Melph	54	38	5FU	84	96
3) Colon cancer			Melph	38	81
MMC	12	62	Cis DDP	71	90
ADR	0	47	BLM	75	95
5FU	4	57	ACTD	76	98
Cispl	7	55	VCR	51	96
4) Colon cancer			8) Hepatoblastoma		
MMC	23	74	MMC	33	85
5FU	32	84	ADR	56	82
Cis DDP	27	74	5FU	50	76
BCNU	5	40	Melph	20	56
5) Malignant melanoma			Cis DDP	75	95
MMC	98	99	BLM	52	95
Cis DDP	70	84	ACTD	68	90
BCNU	24	31	VCR	47	87
			BCNU	28	72



A: original human gastric cancer which was diagnosed as poorly differentiated adenocarcinoma. (Hematoxylin-Eosin stain, $\times 400$)



B: tumor xenograft in nude mouse (first generation). The histologic picture was consistent with that of the original tumor. (Hematoxylin-Eosin stain, $\times 400$)

Fig. 2. Light Microscopy.

両者は原腫瘍のコロニー形成率がそれぞれ0.09%, 0.28%と他の症例に比し非常に良好であった。他の6例は、原腫瘍のコロニー形成率が0.01~0.04%と比較

的低く、ヌードマウス移植腫瘍は原腫瘍に比し4~17倍、平均8倍のコロニー形成を示した。ヌードマウスにおける体積倍加時間と、その腫瘍のコロニー形成率

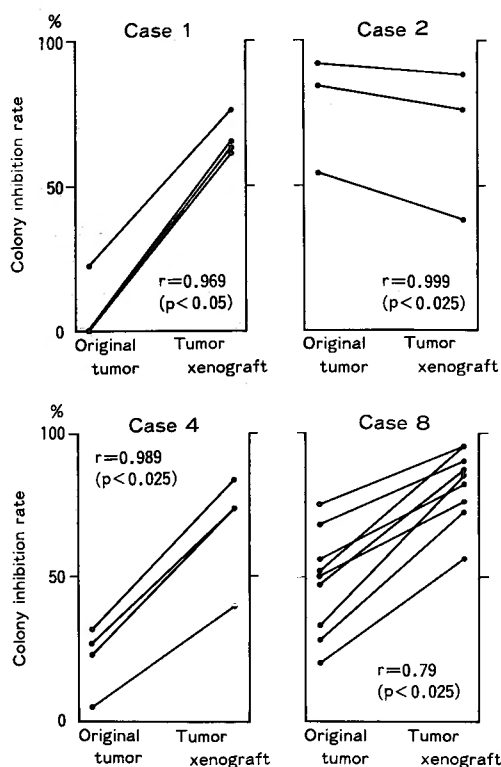


Fig. 3. Colony Inhibition Rate of Anticancer Drugs

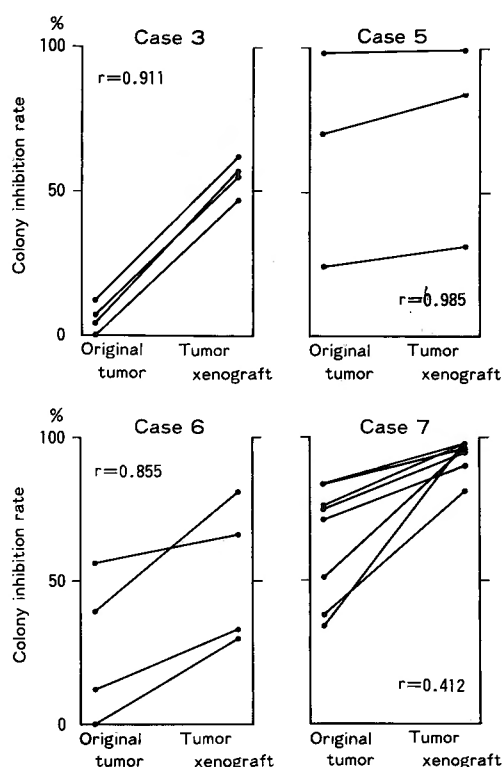


Fig. 4. Colony Inhibition Rate of Anticancer Drugs

との間には、一定の関係を認めなかった。

原腫瘍とヌードマウス移植腫瘍の組織学的検討：

8症例の原腫瘍とヌードマウス移植腫瘍の組織標本を作成し、光顕的に検討した。全例、ヌードマウス移植腫瘍は原腫瘍の組織学的特性を保持し、特別な差異を見出さなかった (Fig. 2)。

制癌剤感受性の比較 (chart 4):

症例により、3種類から9種類の制癌剤に関し検討し得た。症例2と症例5の2例に関しては、ヌードマウス移植腫瘍は、原腫瘍の制癌剤感受性をほぼ同等に保持していた。他の6例は、ヌードマウス移植腫瘍において、制癌剤に対する感受性の亢進を認めた。しかし、各腫瘍の複数制癌剤に対する感受性スペクトラムに関しては、原腫瘍とヌードマウス移植腫瘍との間に大きな差異を認めなかった。そこで、各制癌剤の原腫瘍に対するコロニー形成抑制率と、ヌードマウス移植腫瘍に対するコロニー形成抑制率との相関について検討した。症例1, 2, 4, 8の4例において、各制癌剤の原腫瘍とヌードマウス移植腫瘍とに対するコロニー形成抑制率の間に有意の相関を認めた。(症例1: $p < 0.05$,

症例2, 4, 8: $p < 0.025$) (Fig. 3)。又、症例3, 5も有意では無いが、ヌードマウス移植腫瘍が原腫瘍の制癌剤感受性スペクトラムを良好に保持していると考えられた。症例6においては、4制癌剤中2剤間のみ効果順位の逆転をみた。症例7は全く相関を認めなかった (Fig. 4)。

考 察

Clonogenic assay は、Hamburger, Salmon により開発された *in vitro* の制癌剤感受性試験^{12,13)}、二層軟寒天培地で腫瘍細胞を培養し、その生死をコロニー形成により判定する方法である。制癌剤の抗腫瘍効果は、無処理群に対する薬剤処理群のコロニー形成の減少の程度(コロニー形成抑制率)を算出し、定量的に評価することができる。

Von Hoff ら^{4b)}は、800例の悪性腫瘍に clonogenic assay を施行し、123回の臨床効果との相関の検討を行った。Assay にて感受性ありと判定され、臨床的にも Partial Remission 以上の効果が得られた割合 (true positive rate) は71%、assay で感受性無しと判定され、

臨床的にも効果の認められなかった割合 (true negative rate) は98%と、有意に高い相関を報告している。Assay 判定結果と臨床効果との相関を検討した他の報告^{3,19,28,31)}も同様の高い相関を報告し、clonogenic assay は in vitro の制癌剤感受性試験として非常に予言性の高い試験法と評価されている。

現在まで、さまざまな悪性腫瘍が二層軟寒天培地においてコロニーを形成することが知られ、これを用いた悪性腫瘍の基礎的、臨床的検討が為されている。本実験では、胃癌2例、大腸癌2例、小児悪性腫瘍2例、腎細胞癌1例、悪性黒色腫1例と多種類の腫瘍にわたって検討している。これ等の悪性腫瘍が clonogenic assay において良好にコロニーを形成することは、他の報告においても明らかにされている^{1,14,32,47)}。

Clonogenic assay において、腫瘍細胞と制癌剤との接触には1時間接触法と持続接触法の2法が行われているが、著者は持続接触法を採用している。これは、5-FU 等の time dependent な制癌剤の場合、1時間接触法では十分な効果を示し得ない事²⁸⁾、又、1時間接触法は実験操作が複雑になり手技的な誤差を招き易いためである。

ヌードマウス移植腫瘍は、原腫瘍の組織学的、機能的特性を良好に保持すると報告されている^{10,23,35,36,37)}。又、ヌードマウスを用いた実験化学療法の判定結果と臨床効果とが類似することも報告され^{8,9,16,25,26,29,39)}、ヌードマウス-腫瘍系は、ヒト悪性腫瘍化学療法の良好なモデルとされている。しかし、これらの、判定結果と臨床効果との相関を検討した報告は、症例数及び検討した制癌剤ともに少数であり、今後の症例の蓄積が必要とされている。さらに、複数制癌剤に対する感受性スペクトラムに関する検討は報告されておらず、著者はこの問題点に関し、原腫瘍とヌードマウス移植腫瘍の両者に clonogenic assay を行い、直接制癌剤感受性の比較を行った。

30例の臨床症例に試み、比較可能であったのは8例であった。4例は、感染やコロニー形成不良のため感受性判定ができず、18例は、ヌードマウスへの生着に成功せず検討できなかった。ヌードマウスへの生着率が低値であったのは、21例において原腫瘍から酵素学的分離により作成された腫瘍細胞浮遊液を移植に使用したためである (生着率33%)。これは、たとえ同一腫瘍であっても、その部位により cell kinetics や制癌剤に対する感受性も異なるとされる、腫瘍の Heterogeneity の問題を考慮し^{4,7,14,22,48)}、原腫瘍とヌードマウス

スへ移植した腫瘍の同一性を高めるため細胞浮遊液を使用したものである。実験後期に行ったように、腫瘍を充分細切し均一したものの一部を移植する方法を行えば (生着率56%)、生着率は向上したと考えられる^{17,24,42)}。

コロニー形成率は、6例においてヌードマウス移植腫瘍が原腫瘍に比し良好となり、これらは平均8倍の上昇を示した。

Tveit ら⁴³⁾は、9例のヒト転移性メラノーマと9例のヌードマウス可移植性メラノーマに clonogenic assay を行い、ヌードマウス可移植性メラノーマの方がコロニー形成率が高いという結果を示している。又、Selby ら³³⁾も、immunosuppressed mice にメラノーマを移植し、soft-agar diffusion-chamber を用いてこれらの腫瘍のコロニー形成を検討し、移植腫瘍は著明にコロニー形成が良好であり、継代により更に上昇したと報告している。そしてこれは、cell selection の結果 clonogenic cell の比率が増加するためかもしれないと述べている。

一方、生体内とヌードマウスにおける腫瘍の growth characteristics の変化を指摘する報告が見られ、Ikeuchi ら¹⁵⁾は、ヌードマウス移植腫瘍に H^3 -TdR pulse labelling を行い、その cell kinetic parameter を求め、以前に報告された生体内の腫瘍の parameter と比較し、tumor volume doubling time (以下、TVDT) は短縮しているとし、この理由として生体内の腫瘍は、増殖の plateau phase に達しているのに対し、ヌードマウス移植腫瘍は logarithmic phase に在るためと報告している。

又、Mattern ら²¹⁾は、肺癌4症例について、X線検査によって得られた原腫瘍の TVDT とヌードマウス移植腫瘍の TVDT とを比較し、ヌードマウス移植腫瘍において TVDT の短縮とS期細胞の比率の増大がみられ、かつ継代を重ねると更に TVDT が短縮したと報告し、これらは proliferating cell の比率の増加によるものであると述べている。

著者は、原腫瘍は生体内で定常増殖期にあり、non proliferating cell が多いのに対し^{38,40,41)}、ヌードマウス移植腫瘍は対数増殖期にあり、proliferating cell の比率が高く、これがコロニー形成率の上昇をもたらしたと考えている。

一方、コロニー形成率の低下を来した2例については、原腫瘍がすでに良好なコロニー形成を示す腫瘍であり、ヌードマウス移植腫瘍の in vitro におけるコロ

ニー形成が非常に多数であったため、早期に培養条件の悪化を来し、個々のコロニーの発育が阻害されたため、結果的にコロニー形成率が低下したものである。

ヌードマウス移植腫瘍の TVDT は、症例 7 Neuroblastoma の 4 日から、症例 1 Gastric cancer の 35 日まで平均 12.5 日の値をとった。最も TVDT の短い症例 7 は、in vitro におけるコロニー形成率も著明に高かったが、TVDT 7 日の症例 5 Malignant melanoma は、コロニー形成率 0.02% と低値であり、TVDT 35 日と増殖の遅い症例 1 は、コロニー形成率 0.18% と良好な値を示し、ヌードマウスにおける増殖速度と in vitro におけるコロニー形成率との間には一定の相関を認めなかった。ヌードマウスにおける cell loss factor や、腫瘍にとってのヌードマウスと in vitro の環境の適合性が、増殖速度やコロニー形成率に大きく影響していると考えられた²²⁾。

制癌剤に対する感受性に関しても、ヌードマウス移植腫瘍は、原腫瘍に比し 6 例において高感受性となった。Kirkwood ら¹⁸⁾は、4 例のメラノーマについて、一度培養された細胞は、新鮮あるいは冷凍保存された細胞に比しコロニー形成が良好となり、更に dacarbazine に抵抗性を示した 3 例の冷凍保存細胞が、培養することにより中等度の感受性を示すようになったと報告している。これは、著者の得た結果と類似している。ヌードマウス移植腫瘍の制癌剤感受性が高まるのは、先に述べたように S 期の細胞の比率の増加によるものと考えられる^{34,35)}。

又、著者は、腫瘍細胞と制癌剤とは持続接触法を用いており、plate された制癌剤の経日的な活性の低下という因子も考慮しなくてはならない。

MMC と 5FU に関し、plate 後の薬剤活性の変化を bioassay にて検討したところ、2 剤ともに、plate 後 24 時間の活性に比し、14 日後には薬剤活性は 1/2 に低下した。

ヌードマウス移植腫瘍は対数増殖期にあり、proliferating cell の比率が高く、高感受性となり、生体内の原腫瘍は定常増殖期に達し、Go, long G₁ といわれる non-proliferating cell の割合が大きく^{38,40,41)}、これらの腫瘍細胞のなかには、制癌剤活性の低下した時期に cell cycle に recruit してくる細胞が存在する可能性があり、このため、低感受性を呈する可能性がある。

本研究において、ヌードマウス移植腫瘍は、制癌剤感受性が高まる傾向を示しているが、腫瘍の複数制癌剤に対する感受性スペクトラムについては、比較的良

好に保持していることが明らかにされた。比較し得た 8 例中 4 例については、統計学的に両腫瘍の感受性スペクトラムに有意の相関を認め、2 例は統計学的に有意ではないが、感受性スペクトラムには変化を認めなかった。1 例は 4 薬剤中 2 剤に順位の逆転をみた。全く相関を示さなかった症例 7, neuroblastoma については、ヌードマウス移植腫瘍の制癌剤感受性が著明に上昇したため、ほとんどの制癌剤が 95% 以上のコロニー形成抑制率を示し、正確な感受性スペクトラムを反映できなかったのが原因と考えられる。

ヌードマウス可移植性腫瘍を用いて、その in vivo の制癌剤感受性と soft agar における in vitro の制癌剤感受性を比較し、両者がよく一致することが報告され^{11,44)}、ヌードマウス移植腫瘍の有用性が示されている。本研究においても、ヌードマウス移植腫瘍は、制癌剤に対する感受性は高まるものの、感受性スペクトラムは良好に保持しており、ヌードマウス移植腫瘍を用いた実験化学療法は、その効果判定基準を誤らなければ、悪性腫瘍化学療法の有用なモデルであることが明らかにされた。しかし本研究では、ヌードマウス移植腫瘍は初代あるいは 2 代目の腫瘍を使用しており、長期間継代保持している腫瘍に関しては、原腫瘍の感受性スペクトラムが良好に保持されているかどうかは不明である。この点に関して、丸尾ら²⁰⁾は、ヌードマウス可移植性ヒト肺癌の Bleomycin に対する感受性を、約 5 年半の間隔をおいて、継代 7 代目と 36 代目の腫瘍について検討し、両者が非常によく一致する dose response 曲線を描いたと述べ、ヌードマウス移植腫瘍は、制癌剤に対する感受性をよく維持し、再現性を保っていると報告している。

一方、Bogden ら⁵⁾は、rat mammary adenocarcinoma がヌードマウスにおいて 20 代の継代を重ねることによって、生化学的にも制癌剤に対する感受性も変化し、長期間の安定性に問題があると報告している。ヌードマウスにおける長期継代の制癌剤感受性に対する影響については、今後の検討が必要である。

結 語

ヌードマウス移植腫瘍が、ヒト原腫瘍の制癌剤に対する感受性を保持しているかどうかを明らかにする目的で、in vitro の制癌剤感受性試験である clonogenic assay を用いて、両腫瘍の感受性を比較検討した。30 症例に比較を試み、8 例において比較検討可能であり、以下の結果を得た。

- ① 組織学的検討において、ヌードマウス移植腫瘍はヒト原腫瘍の特性を良好に保持していた。
- ② in vitro におけるコロニー形成率は、ヌードマウス移植腫瘍が原腫瘍に比し著明に良好となった。
- ③ 制癌剤に対する感受性も、ヌードマウス移植腫瘍が高くなった。
- ④ ヌードマウス移植腫瘍は、原腫瘍の複数制癌剤に対する感受性スペクトラムを良好に保持していた。
- ⑤ ヌードマウス移植腫瘍は、ヒト癌化学療法の有効なモデルであることが示された。

稿を終えるにあたり、御懇篤な御指導と御校閲を賜りました、京都大学第2外科、日笠頼則教授に深甚なる感謝の意を表します。

さらに、直接の御指導・御鞭撻をいただきました、京都大学第2外科、里村紀作助教授・福井医科大学第2外科、谷川允彦助教授に深く感謝いたします。

本論文の要旨は、第21回日本癌治療学会総会にて報告した。

参 考 文 献

- 1) Agrez MV, Kovach JS, et al: Human colorectal carcinoma: Patterns of sensitivity to chemotherapeutic agents in the human tumor stem cell assay. *J Surg Oncol* **20**: 187-191, 1982.
- 2) Alberts DS, Chen HSG: Tabular summary of pharmacokinetic parameters relevant to in vitro drug assay. In *Cloning of human tumor stem cells*, pp. 351-359. New York: Alan R Liss, Inc, 1980.
- 3) Alberts DS, Salmon SE, et al: In-vitro clonogenic assay for predicting response of ovarian cancer to chemotherapy. *Lancet*: 340-342, 1980.
- 4) Biörklund A, Hakansson L, et al: On heterogeneity of non-hodgkin's lymphomas as regards sensitivity to Cytostatic drugs. *Europ J Cancer* **16**: 747-654, 1980.
- 5) Bogden AE, Kelton DE, et al: Effect of serial passage in nude athymic mice on the growth characteristics and chemotherapy responsiveness of 13762 and R3230AC mammary tumor xenografts. *Cancer Res* **38**: 59-64, 1978.
- 6) Flanagan SP: 'Nude', a new hairless gene with pleiotropic effects in the mouse. *Genet Res (Camb)* **8**: 295-309, 1966.
- 7) Friedman M, Nervi C, et al: Significance of growth rates, cell kinetics, and histology in the irradiation and chemotherapy of squamous cell carcinoma of the mouth. *Cancer* **31**: 10-16, 1973.
- 8) 藤田昌英: ヌードマウス移植ヒト消化器癌による研究. *癌と化学療法* **7**: 949-956, 1980.
- 9) 藤 昌英, 田口鐵男: ヌードマウスを用いる制癌剤感受性テスト. *癌と化学療法* **9**: 606-615, 1982.
- 10) Giovanella BC, Stehlin JS, et al: Heterotransplantation of human cancers into nude mice. A model system for human cancer chemotherapy. *Cancer* **42**: 2269-2281, 1978.
- 11) Gupta V, Krishan A, et al: Correlation of in vitro clonogenic assay data with in vivo growth delays and cell cycle changes of a human melanoma xenograft. *Cancer Res* **43**: 2560-2564, 1983.
- 12) Hamburger AW, Salmon SE: Primary bioassay of human tumor stem cells. *Science* **197**: 461-463, 1977.
- 13) Hamburger AW, Salmon SE: Primary bioassay of human myeloma stem cells. *J Clin Invest* **60**: 846-854, 1977.
- 14) Heppner GH, Dexter DL, et al: Heterogeneity in drug sensitivity among tumor cell subpopulations of a single mammary tumor. *Cancer Res* **38**: 3758-3763, 1978.
- 15) Ikeuchi S, Shimozato Y, et al: Cell Kinetic study of human cancers transplanted to nude mice. *Expl Cell Biol* **48**: 218-228, 1980.
- 16) 井上雄弘, 藤本修一, 他: ヒト乳癌とヌードマウス移植ヒト乳癌 (MX-1) における各種抗癌剤の抗腫瘍効果の相関に関する研究. *日癌治* **18**: 13-20, 1983.
- 17) 河村栄二, 久保田哲朗, 他: ヒト消化器癌/ヌードマウス系の可移植性に関する諸因子の解析. *日癌治* **18**: 21-29, 1983.
- 18) Kirkwood JM, Marsh JC: In vivo drug sensitivity assay of clonogenic human melanoma cells and correlation with treatment outcome. *Cancer Res* **43**: 3434-3440, 1983.
- 19) Mann BD, Kern DH, et al: Clinical correlations with drug sensitivities in the clonogenic assay. *Arch Surg* **117**: 33-36, 1982.
- 20) 丸尾幸嗣, 上山義人, 他: ヌードマウスに移植されたヒト腫瘍の安定性-抗腫瘍剤に対する感受性について. *医学のあゆみ* **123**: 1006-1008, 1982.
- 21) Mattern J, Wayss K, et al: Different growth rates of lung tumors in man and their xenografts in nude mice. *Europ J Cancer* **16**: 289-291, 1980.
- 22) Meck RA, Ingram M, et al: Establishment and cell cycle kinetics of a human squamous cell carcinoma in nude mice and in vitro. *Cancer Res* **41**: 1076-1085, 1981.
- 23) 永井完治, 下里幸雄, 他: 人の腫瘍のヌードマウスへの移植-移植成績と移植腫瘍の性状について. *癌の臨床* **22**: 745-754, 1976.
- 24) 中谷勝紀: ヒト胃癌のヌードマウスへの移植. *日外会誌* **81**: 1083-1085, 1980.
- 25) Osieka R, Houchens DP, et al: Chemotherapy of human colon cancer xenografts in athymic nude mice. *Cancer* **40**: 2640-2650, 1977.

- 26) Ovejera AA, Houchens DP, et al: Sensitivity of a human tumor xenografts in nude (athymic) mice to various clinically-active drugs. Proc 2nd Intl Workshop on Nude Mice: 451-460, 1977.
- 27) Pantelouris EM: Absence of thymus in a mouse mutant. Nature **217**: 370-371, 1968.
- 28) Park CH, Wiernik PH, et al: Clinical correlations of leukemic clonogenic cell chemosensitivity assessed by in vitro continuous exposure to drug. Cancer Res **43**: 2346-2349, 1983.
- 29) Povlsen Co, Jacobsen GK: Chemotherapy of a human malignant melanoma transplanted in the nude mice. Cancer Res **35**: 2790-2796, 1975.
- 30) Rygaard J, Povlsen Co: Heterotransplantation of a human malignant tumor to "nude" mice. Acta path microbiol scand **77**: 758-760, 1969.
- 31) Salmon SE, Hamburger AW, et al: Quantitation of differential sensitivity of human-tumor stem cells to anticancer drugs. N Engl J Med **298**: 1321-1327, 1978.
- 32) Sarosdy MF, Lamm DL, et al: Clonogenic assay and in vitro chemosensitivity testing of human urologic malignancies. Cancer **50**: 1332-1338, 1982.
- 33) Selby PJ, Courtenai VD, et al: Colony growth and clonogenic cell survival in human melanoma xenografts treated with chemotherapy. Br J Cancer **42**: 438-447, 1980.
- 34) Shackney SE, McCormack GW, et al: Growth rate patterns of solid tumors and their relation to responsiveness to therapy. Ann Intern Med **89**: 107-121, 1978.
- 35) 下里幸雄: ヌードマウス, その癌研究への応用. 蛋白質, 核酸, 酵素 **23**: 719-732, 1978.
- 36) Shimosato Y, Kameya T, et al: Transplantation of human tumors in nude mice. J Natl Cancer Inst **56**: 1251-1260, 1976.
- 37) Sordat B, Fritsché R, et al: Morphological and functional evaluation of human solid tumors serially transplanted in nude mice. Proc 1st Intl Workshop on Nude Mice: 269-278, 1974.
- 38) Straus MJ, oran RE: Cell cycle parameters in human solid tumors. Cancer **40**: 1453-1461, 1977.
- 39) 田口鐵男, 薄金真雄, 他: Nude Mouse を用いた制癌剤感受性試験について. 最新医学 **33**: 2300-2305, 1978.
- 40) Terz JJ, Curutchet HP, et al: Analysis of the cell kinetics of human solid tumors. Cancer **28**: 1100-1110, 1971.
- 41) Terz JJ, Lawrence W, et al: Analysis of the cycling and noncycling cell population of human solid tumors. Cancer **40**: 1462-1470, 1977.
- 42) 角田富士男: ヌードマウスにおけるヒト癌生着を左右する諸因子の検討と問題点. 日外会誌 **82**: 1415-1429, 1981.
- 43) Tveit KM, Endresen L, et al: Comparison of two soft agar methods for assaying chemosensitivity of human tumors in vitro: malignant melanomas. Br J Cancer **44**: 539-544, 1981.
- 44) Tveit KM, Fodstad, et al: In vitro sensitivity of human melanoma xenografts to cytotoxic drugs. Correlation with in vivo chemosensitivity. Int J Cancer **26**: 717-722, 1980.
- 45) Volm M, Krieg L, et al: Effect of synchronization on chemotherapy of solid transplanted tumors. Europ J Cancer **13**: 1099-1108, 1977.
- 46) Von Hoff DD, Casper J, et al: Association between human tumor colony-forming assay results and response of an individual patient's tumor to chemotherapy. Am J Med **70**: 1027-1032, 1981.
- 47) Von Hoff DD, Casper J, et al: Direct cloning of human neuroblastoma cells in soft agar culture. Cancer Res **40**: 3591-3597, 1980.
- 48) Wallen CA, Michaelson SM, et al: Influence of location within a tumor on cell survival as measured by a clonogenic assay. Cancer Res **41**: 989-993, 1981.